



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00195

(22) Data de depozit: 15/04/2022

(41) Data publicării cererii:  
30/10/2023 BOPI nr. 10/2023

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE  
- DEZVOLTARE PENTRU  
OPTOELECTRONICĂ - INOE 2000,  
STR.ATOMIȘTILOI, NR.409, CP-OP MG 05,  
MĂGURELE, IF, RO

(72) Inventatori:  
• GOMOIU IOANA,  
STR. CETATEA DE BALTĂ NR.22, BL.O 6,  
SC.C, ET.7, AP.156, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• RUGINESCU ROBERT,  
STR.PETRE LICIU, NR.5, BL.5, AP.7,  
FOCȘANI, VN, RO;

• NEAGU SIMONA ELENA,  
STR. TINERETULUI, NR.2B, SC.B, ET.3,  
AP.85, SAT DUDU, CHIAJNA, IF, RO;  
• COJOC ROXANA LUCIA,  
ȘOS. COLENTINA, NR.2, BL.1, SC.6,  
AP.244, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;  
• ENACHE MĂDĂLIN, STR. MIXANDREI,  
NR.37, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;  
• GHERASE LUMINIȚA, STR. BUJORILOR,  
NR.3, BL.B20, SC.1, AP.3, MĂGURELE, IF,  
RO;  
• RĂDVAN ROXANA, STR.BABA NOVAC,  
NR.17, BL.G13, SC.1, AP.20, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• MOHANU ILEANA,  
STR.ROMANCIERILOR NR.2, BL.C 4, SC.A,  
ET.1, AP.8, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU DE ÎNDEPĂRTARE A CONSOLIDANȚILOR  
ȘI A DEPUNERILOR ORGANICE DE PE SUPRAFAȚA  
PICTURILOR MURALE FOLOSIND ESTERAZE BACTERIENE  
IMOBILIZATE ÎN GEL PE BAZĂ DE POLIZAHARIDE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de îndepărtare a consolidanților și a depunerilor organice de pe suprafața picturilor murale. Procedeu, conform invenției, constă în etapele:

(1) prepararea unei soluții enzimatică din pudră acetonică în tampon fosfat de potasiu la pH 7, 5,

(2) prepararea unui gel pe bază de polizaharide extrase din alge din familia *Rhodophyceae* sau bacterii din specia *Xanthomonas campestris* cu esterase immobilizate (1:1),

(3) ajustarea dimensiunii gelului în funcție de dimensiunea suprafeței de tratat,

(4) aplicarea gelului pe suprafață,

(5) incubare,

(6) îndepărtare gel,

(7) curățarea mecanică a gelului

(8) uscare și

(9) evaluarea eficienței de curățare prin tehnici

complementare uzuale.

Revendicări: 2

Figuri: 2

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



## PROCEDEU DE ÎNDEPĂRTARE A CONSOLIDANȚILOR ȘI A DEPUNERILOR ORGANICE DE PE SUPRAFAȚA PICTURILOR MURALE FOLOSIND ESTERAZE BACTERIENE IMOBILIZATE ÎN GEL PE BAZA DE POLIZAHARIDE

Prezenta invenție se referă la o metodă de îndepărtare a depunerilor reprezentate de compuși organici: ceara, uleiul, funinginea și a consolidanților folosiți la restaurări anterioare: rășina acrilică Paraloid B72 și dispersia transparentă de caseinat de calciu, de pe suprafața picturilor murale, prin tratamentul cu hidrolaze de tipul esterazelor de origine bacteriană immobilizate în gel pe bază de polizaharide.

Consolidanții folosiți în restaurare, precum rășina acrilică Paraloid B72 și dispersia transparentă de caseinat de calciu, sunt expuși în timp procesului de îmbătrânire, respectiv de modificare a proprietăților fizice și chimice, incompatibile cu menținerea rolului de fixare a peliculei de culoare. Pe suprafața consolidanților sau direct pe suprafața picturii murale, ca urmare a nerespectării normelor de conservare, se acumulează depuneri organice (ulei, ceară, funingine). În prezent, pentru îndepărtarea unor astfel de materiale, se folosesc fie solvenți volatili, care prezintă risc pentru sănătatea operatorului, fie solvenți organici lichizi a căror acțiune pe suprafață nu poate fi controlată corespunzător.

Procedeul de îndepărtare a materialelor de restaurare și a depunerilor constă în aplicarea pe suprafețe de pictură murală a gelului pe bază de polizaharide, ce conține esteraze halotolerante de origine bacteriană immobilizate, pentru un timp variabil în care are loc hidroliza enzimatică parțială a acestora.

La nivel internațional nu se cunosc documente referitoare la aplicarea esterazelor halotolerante obținute din bacterii halotolerante în domeniul îndepărtării depunerilor de natură organică sau a consolidanților de pe suprafețe pictate. Se cunoaște, în schimb, din documentul [1], în scopul îndepărtării cleiului de origine animală de pe pictura murală, un protocol bazat pe folosirea agarului bacteriologic adăugat după plasarea suspensiei de *Pseudomonas stutzeri*, cu scopul menținerii mediului umed. Procedeul presupune menținerea temperaturii de 20°C - 30°C folosind o lampă în IR, îndepărtarea și uscarea. Eficiența tratamentului a fost evaluată prin examinarea directă și în UV, FTIR (spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier), cromatografie de masă, și controlul microbiologic pentru viabilitatea celulelor. Această metodă prezintă dezavantajul că folosește celule vii și se aplică numai pentru depunerile cleiului de origine animală. De asemenea, procedeul implică o metodă suplimentară de evaluare a eficienței, respectiv testul de viabilitate a celulelor. Invenția propusă înlătură toate neajunsurile prin faptul că nu se folosesc celule vii, ci un complex de esteraze, ceea ce elimină testul de viabilitate și se poate aplica pe o gamă largă de depuneri precum Paraloid B72, dispersia transparentă de caseinat de calciu, ceară, ulei și funingine. În plus, procedeul propus se evaluează și prin microscopie electronică, colorimetrie respectiv imagistică hiperspectrală.

Pentru îndepărtarea eflorescențelor reprezentate de nitrații de pe suprafața picturii murale, se cunoaște, la nivel internațional, documentul care prezintă folosirea gelului de agar ca parte componentă a unui sistem de biocurățare [2]. În acest scop se propune plasarea hârtiei japoneze pe suprafața pictată, apoi prin pensulare aplicarea suspensiei de celule bacteriene de *Pseudomonas stutzeri* și în final a gelului de agar. Metoda respectivă implică menținerea constantă a temperaturii, la 25°C - 28°C și a RH la 70%, apoi după tratament, îndepărtarea cu spatula a hârtiei japoneze și a gelului de agar, curățarea cu buretele umed a suprafeței tratate și evaluarea rezultatului prin analize microscopice și fizico-chimice (FTIR și cromatografia de schimb ionic). Metoda prezintă multiple dezavantaje: este necesară menținerea constantă a temperaturii într-un interval scurt pe parcursul tratamentului, folosind o lampă în infraroșu și, de asemenea, este necesară monitorizarea creșterii bacteriilor prin teste biochimice și microscopie; în plus, pentru realizarea metodei se folosesc celule vii și se poate aplica numai

pentru depunerile de săruri, gelul de agar având doar rolul de a asigura un mediu umed. Invenția propusă înlătură toate aceste neajunsuri prin faptul că nu se folosesc celule vii ci un complex de esteraze, ceea ce elimină necesitatea monitorizării creșterii bacteriene în timpul tratamentului, reducând astfel costul și timpul de realizare. Enzimele sunt imobilizate în gelul pe bază de polizaharide iar activitatea lor hidrolitică se derulează pe tot parcursul tratamentului. Complexul esterolitic este activ pe un palier mai mare de valori de temperatură și pH, între 20<sup>0</sup>C-30<sup>0</sup>C, respectiv pH=7,0-10,0 și concentrație de săruri = 0-2M. Se aplică pe o gamă largă de depuneri, precum Paraloid B72, dispersia transparentă de caseinat de calciu, ceară, ulei și funingine. În plus, procedeul propus se evaluează și prin microscopie electronică, colorimetrie, respectiv imagistică hiperspectrală.

Din documentul [3] se cunoaște, la nivel internațional, un procedeu de îndepărtare a cleiului animal polimerizat de pe pictura murală folosind celule de *Pseudomonas stutzeri* imobilizate în gel de agar care conține și mediu nutritiv. Timpul de tratament sugerat este între 60-180 minute, după care suprafața se curăță cu un burete umed. Acest procedeu este eficient la 35<sup>0</sup>C și 50% RH. Evaluarea eficienței procedeeului include difracția de raze X, spectroscopia FTIR, și SEM-EDX. Procedeul propus în prezenta invenție se referă la imobilizarea esterazelor în gel pe bază de polizaharide, evitând astfel folosirea unor microorganisme cu potențial în biodeteriorare. Complexul esterolitic este activ la valori de temperatură caracteristice zonelor temperate (20<sup>0</sup>C- 30<sup>0</sup>C), pe suprafețe cu pH neutru-alkalin (7,0-10,0) și eflorescențe (0-2M). Evaluarea eficienței procedeeului este complexă și include: microscopia optică, microscopia electronică cu baleiaj, colorimetrie, spectroscopia FTIR și imagistică hiperspectrală.

Se cunoaște, în scopul îndepărtării depunerilor de natură proteică, din documentul [4], un protocol bazat pe folosirea pepsinei porcine incluse în gel de celuloză și a proteazei fungice inclusă în același gel. Procedeul include plasarea gelului pe pictură cu o compresă groasă din bumbac, acoperirea cu poliester transparent, îndepărtarea și 2 etape de curățare dintre care una cu white spirit. Evaluarea eficienței biocurățării include microscopia (optică, electronică, cu forță atomică) și colorimetria. Procedeul propus în prezenta invenție se bazează pe un complex esterazic și nu pe o singură enzimă, ceea ce determină hidroliza unei game complexe de depuneri. Este mai simplu de preparat și de aplicat, evitându-se riscul contaminării în timpul aplicării prin folosirea materialelor precum compresa din bumbac. În plus, pentru curățare se folosește o singură etapă, eliminându-se cea cu white spirit. Evaluarea include microscopia optică și electronică, colorimetria și alte două metode - analiza FTIR și imagistica hiperspectrală.

Se cunoaște, de asemenea, un procedeu de îndepărtare a cleiului animal și a cerii de pe pictura pe pânză, respectiv sculptură, folosind enzime extrase din nevertebrate marine integrate în geluri precum Gelan și Klucel [5]. Procedeul constă în aplicarea gelului, incubarea, îndepărtarea gelului, curățarea uscată și umedă cu un burete. Evaluarea eficienței include analiza FTIR, HPLC (cromatografia de înaltă performanță în fază lichidă) și electroforeza în gel de Dodecyl Sulfat-Poliacrilamidă. Procedeul prezintă dezavantajul că nu poate fi aplicat pe pictura murală iar gelurile folosite colmatează porii atât la nivelul stratului pictural cât și al mortarului. Acest dezavantaj este eliminat prin folosirea gelului pe bază de polizaharide, în care se imobilizează complexul esterazic. Procedeul propus în prezenta invenție elimină și dezavantajul recoltării animalelor marine și se bazează pe obținerea complexului esterazic prin cultivarea unei specii de bacterii halotolerante, în condiții de laborator, controlate, în cantitatea necesară și la momentul folosirii. În plus, evaluarea eficienței include și alte metode, precum microscopia optică și electronică, analize FTIR și imagistica hiperspectrală.

Procedeul de îndepărtare a consolidanților și a depunerilor organice de pe suprafața picturilor murale folosind esteraze bacteriene imobilizate în gel pe bază de polizaharide,

conform invenției, include următoarele etape, după cum sunt ilustrate în Figura 1: prepararea concentratului esterazic din lichidul de cultură bacterian (1), prepararea soluției esterazice din concentrat având 0,48 mg/ml (2), prepararea gelului pe bază de polizaharide cu esteraze immobilizate (1/1) în soluție tampon fosfat (3), aplicarea gelului cu esteraze immobilizate (4), incubarea (5), îndepărtarea gelului (6), curățarea mecanică (7), uscarea (8), evaluarea eficienței îndepărtării depunerilor (9). În funcție de rezultatul etapei de evaluare a eficienței biocurățării, etapele 3-8 pot fi repetate.

În plus față de stadiul tehnicii cunoscut, invenția prezintă avantajul că este primă oară când se elaborează un procedeu de îndepărtare a depunerilor organice și a consolidanților folosind enzime halotolerante obținute prin cultivarea unei specii de bacterie în condiții de laborator riguros controlate. De asemenea este pentru prima dată când complexul esterazic de origine bacteriană este immobilizat într-un gel folosit în restaurare, care nu pătrunde în porii suprafeței pe care se aplică. Gelul pe bază de polizaharide obținut în tampon fosfat asigură dispersia complexului enzimatic și pH optim pentru activitatea acestuia. Suportul cu esteraze immobilizate are rolul de a hidroliza depunerile, fără a dăuna stratului pictural.

Procedeul de folosire a esterazelor halotolerante immobilizate în gelul pe bază de polizaharide pentru îndepărtarea consolidanților și a depunerilor organice propus pentru prima dată, este compatibil cu activitate de hidrololazică și este ușor de aplicat.

Procedeul de îndepărtare a depunerilor, conform invenției, prezintă următoarele avantaje:

- este o metodă ecologică alternativă la curățarea chimică pe bază de solvenți;
- este eficient pentru pictura murală pe care sunt consolidanți comercializați (rășina acrilică Paraloid B72) și artizanali (dispersia transparentă de caseinat de calciu) sau depuneri organice (ceară, ulei, funingine);
- este eficient în activitatea de restaurare a picturii murale *in situ*;
- este eficient în activitatea de restaurare a picturii murale extrase;
- procesul de biocurățare este înalt selectiv deoarece gelul pe bază de polizaharide reține enzimele, menține condițiile optime de aciditate și nu afectează estetic sau structural suprafața pe care se aplică;
- transparența gelului pe bază de polizaharide permite controlul hidrolizei depunerilor ne-transparente;
- gelul pe bază de polizaharide cu esteraze immobilizate are proprietăți adezive și poate fi aplicat pe suprafețe drepte sau înclinate;
- procedeul este ușor de efectuat;
- procedeul este eficient în condiții aerobe;
- procedeul se aplică la valori de temperatură de 20<sup>0</sup>C- 30<sup>0</sup>C, pe suprafețe cu pH neutru-alkalin (7,0-10,0) și eflorescențe (0-2M) ;
- nu generează eflorescențe;
- procedeul nu este toxic, ci ecologic;
- nu impune restricții de operare;
- nu produce denaturări cromatice;
- permite inițierea unui nou proces de restaurare;
- este un procedeu fără riscuri pentru operatori și mediu deoarece nu se folosesc compuși toxici cu posibilitatea de a ajunge în sol sau nivelul freatic.

Sunt prezentate în continuare două exemple de aplicare a procedurii de îndepărtare a materialelor de restaurare de tipul consolidanților și a depunerilor organice conform invenției.

#### Exemplul 1

Exemplul 1 de realizare a invenției, în legătură cu Figura 2, constă în: prepararea soluției enzimice (esteraze) din pudra acetonică în tampon fosfat de potasiu la pH 7,5 (1), prepararea gelului pe bază de polizaharide extrase din algele încadrate în familia

*Rhodophyceae* (Agarart) cu estaraze imobilizate (1:1) în tampon fosfat de potasiu la pH 7,5 (2), ajustarea dimensiunii gelului în funcție de dimensiunea suprafeței de tratat (3), aplicarea gelului pe suprafață (4), incubarea (5), îndepărtarea gelului (6), curățarea suprafeței (7), uscarea (8) și evaluarea eficienței (9) prin examinare vizuală, colorimetrie, microscopie optică și electronică cu baleiaj, spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier, imagistică hiperspectrală. Dacă este nevoie, procedeul poate fi aplicat din nou.

Metoda se aplică cu succes în bisericile unde umiditatea relativă are valori ridicate, în cele rupestre, în cele situate în peșteri și în catacombe în care sunt montați senzori pentru înregistrarea umidității relative și a temperaturii, cu prevenirea formării curenților de aer și a accesului beneficiarilor. Gelul de Agarart nu pătrunde în structura poroasă.

#### Exemplul

Exemplul 2 de realizare a invenției, în legătură cu figura 2, constă în: prepararea soluției enzimatică (esteraze) din pudra acetonică în tampon fosfat de potasiu la pH 7,5 (1), prepararea gelului pe bază de polizaharide extrase din bacteria *Xanthomonas campestris* (Vanzan), cu estaraze imobilizate (1:1) în tampon fosfat de potasiu la pH 7,5 (2), ajustarea dimensiunii gelului în funcție de dimensiunea suprafeței de tratat (3), aplicarea gelului pe suprafață (4), incubarea (5), îndepărtarea gelului (6), curățarea mecanică (7), uscarea (8). Ultimul pas constă în realizarea evaluării eficienței procesului de curățare (9), prin examinare vizuală, colorimetrie, microscopie optică, microscopie electronică de baleiaj, spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier, imagistică hiperspectrală.

Această variantă de realizare a procedurii are aceeași eficiență cu cea prezentată în Exemplul 1, dar poate fi utilă pe substraturi cu porozitate mare, deoarece gelul pătrunde parțial în unii pori dar nu îi colmatează total.

#### BIBLIOGRAFIE

1. Bosch-Roig P., Regidor-Ros J.L., Soriano-Sancho P., Rosa M Montes-Estellés R.M., *Chimica Oggi - Chemistry Today*, 2013, 31, 1, 50-53.
2. Bosch-Roig P., Regidor-Ros J.L., Montes-Estellés R.M., *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013, 84, 266 -274.
3. Abeer Fouad ElHagrassy A.F, *International Journal of Archaeology*, 2019, 7, 1, 8-16.
4. Pereira C., Busani T., Branco L.C., Joosten I., Sandu I.C., *Microsc. Microanal.*, 2013, 19, 1632–1644, 2013, doi:10.1017/S1431927613013196
5. Palla F., Barresi G., Giordano A., Schiavone S., Trapani M.R., Rotolo V., Parisi M.G., Cammarata M., *International Journal of Conservation Science*, 2016, 7, 1, 239-246

**REVENDICĂRI**

1. Procedeu de îndepărtare a consolidanților și a depunerilor organice de pe suprafața picturilor murale, picturilor pe suport lemnos și suport litic cu policromie, **caracterizat prin aceea că** utilizează esteraze bacteriene imobilizate în gel pe bază de polizaharide.
2. Procedeu conform revendicării (1), **caracterizat prin aceea că** include următoarele etape: prepararea soluției enzimaticice (esteraze) din pudra acetonică în tampon fosfat de potasiu la pH 7,5 (1), prepararea gelului de agarart cu esteraze imobilizate (1:1) (2), ajustarea dimensiunii gelului în funcție de dimensiunea suprafeței de tratat (3), aplicarea gelului pe suprafață (4), incubarea (5), îndepărtarea gelului (6), curățarea suprafeței (7), uscarea (8) și evaluarea eficienței (9). Toate materialele folosite sunt incinerate pentru a preveni colonizarea acestora de către bacterii și fungi.

16

DESENE EXPLICATIVE

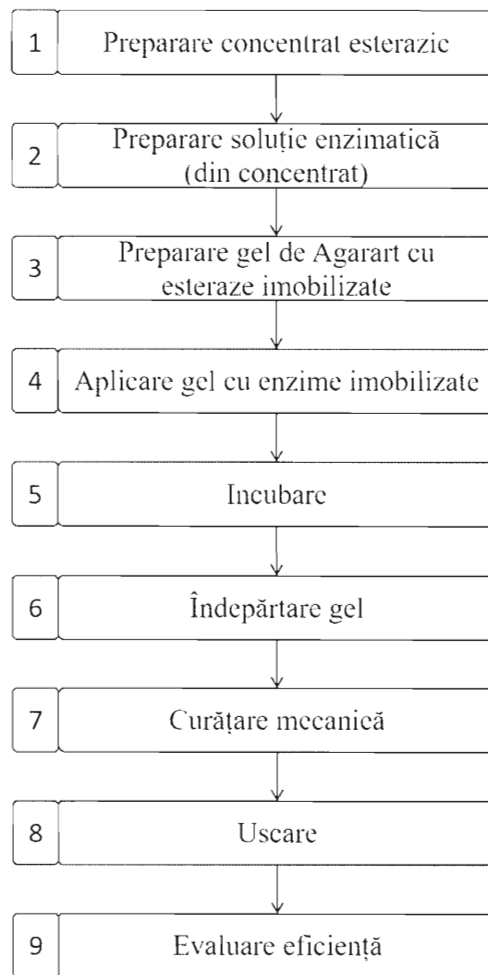


Figura 1. Pașii procedurii de îndepărtare a consolidanților și a depunerilor organice de pe suprafața picturilor murale folosind esteraze bacteriene immobilizate în gel

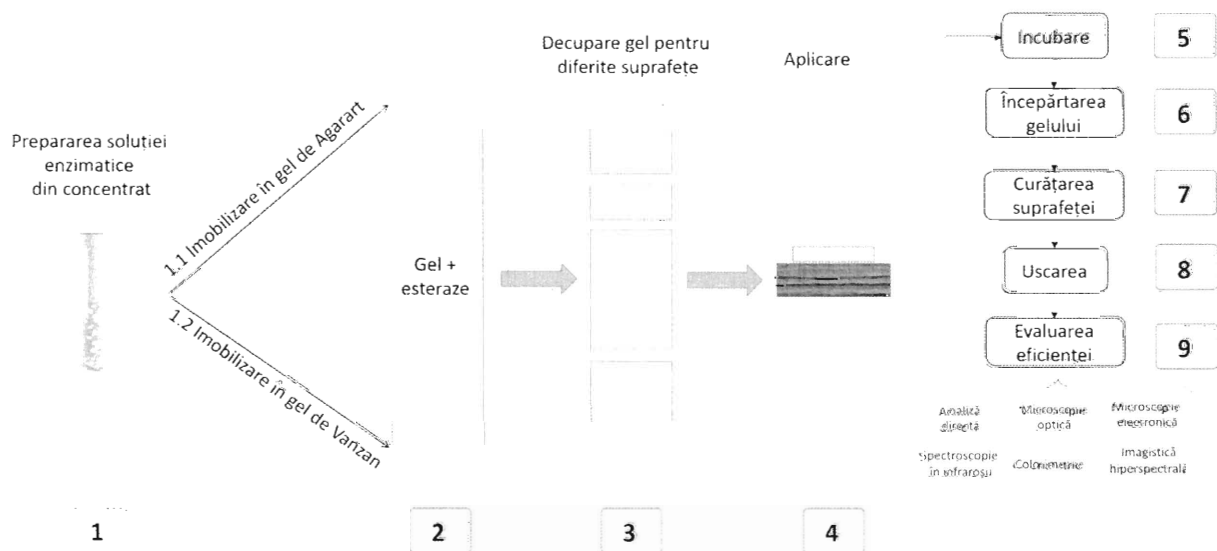


Figura 2. Exemplu de realizare a procedurii de îndepărtare a consolidanților și a depunerilor organice de pe suprafața picturilor murale folosind esteraze bacteriene immobilizate în gel